

О Т З Ы В

на автореферат диссертации Н.А. Плеханова «Анализ структуры и экспрессии генов факторов адаптации у генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Основным возбудителем седьмой пандемии холеры, начавшейся на острове Сулавеси (Индонезия) в 1961 г., на протяжении более полувека продолжает оставаться *V. cholerae* O1 biotype El Tor, геном которого подвержен эволюционным преобразованиям. Так, начальный период седьмой пандемии холеры (весна 1961 г. - октябрь 1962 г.) обязан холерному вибриону Эль Тор, гемолизположительному, открытому в 1905 г. F. Gotschlich. Экспансия гемолитических вибрионов Эль Тор продолжалась до октября 1962 г., когда возбудитель в результате изменений, произошедших в его геноме, утратил способность гемолизировать эритроциты барана. Новый вариант вибриона Эль Тор был назван *Vibrio El Tor var. anhaemolyticus*, а впоследствии – типичный токсигенный холерный вибрион биовара Эль Тор. Его геном содержит гены оперона *ctxAB*, кодирующего синтез термолabileчного экзотоксина – главного патогенетического фактора холеры Эль Тор. Типичные токсигенные вибрионы Эль Тор (*Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor, Hly-, *ctxA*+) оказались более устойчивыми к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, чем классические, что объясняется присутствием в их геноме дополнительных блоков генов, обеспечивающих высокий уровень адаптации к меняющимся условиям окружающей среды: островков патогенности (VPI-I,II) и пандемичности (VSP-I,II), и явились эиологическим фактором холеры в Азии (1961-1969 гг.), в Азии, Африке, Европе, США, Океании (1970-1980 гг.), в Азии, Африке, Европе, США, Океании, Австралии (1981-1990 гг.). В

начале 90-х годов прошлого столетия появились штаммы холерного вибриона O1 серологической группы с типичными фенотипическими признаками биовара Эль Тор, продуцирующие классический тип энтеротоксина (СТ-1) и с фенотипическими признаками биоваров Эль Тор и классического, но также с продукцией энтеротоксина классического типа (СТ-1). Изоляты *V. cholerae* O1 с генотипическими признаками обоих биоваров получили название генетически измененные, гибридные или просто геноварианты биовара Эль Тор, и они являются доминантными этиологическими агентами современного этапа развития седьмой пандемии холеры Эль Тор, начавшегося в 90-е годы XX столетия, а в первые два десятилетия XXI века, получившие глобальное распространение. Исследования механизмов адаптации штаммов геновариантов к действию абиотических факторов внешней среды, несомненно, позволит установить причины широкого распространения появившихся геновариантов холерного вибриона биовара Эль Тор.

В свете вышеизложенного и сформулирована Н.А. Плехановым цель работы, заключающаяся в «выявлении особенностей в структуре и экспрессии генов, кодирующих факторы адаптации к неблагоприятным воздействиям внешней среды, у штаммов геновариантов *Vibrio cholera* биовара Эль Тор, завезенных в разные годы на территорию Российской Федерации, и анализ их устойчивости к действию стрессовых факторов» является обоснованной, своевременной и актуальной.

Решение задач, направленных на достижение указанной цели, позволили автору получить данные о структуре генов адаптации, обеспечивающих у геновариантов подвижность, биосинтез экзополисахарида, регулирующих архитектуру биопленки, кодирующих регуляторные белки RpoS, LuxO и HarR, которые не отличаются от структурных генов адаптации у типичных токсигенных холерных вибрионов биовара Эль Тор. Не выявлено также различий между штаммами геновариантов и типичными токсигенными вибрионами биовара Эль Тор в их способности формировать биопленку *in vitro*, имеющих разную структуру острова пандемичности VSP-II. Изучая механизм

адаптации возбудителя холеры к действию неблагоприятных факторов окружающей среды, автор установил, что в отличие от типичных изолятов Эль Тор, геноварианты оказались более устойчивыми к действию температурного (5 °С и 42 °С), осмотического (3 моль раствор хлорида натрия) и оксидативного (20 ммоль раствор перекиси водорода) факторов стресса. Автор установил, что механизм устойчивости штаммов геновариантов к высокой температуре (42 °С) связан с увеличением биосинтеза белков-поринов внешней мембраны OmpT/OmpU, а к низкой температуре и осмотическому стрессу – с продукцией экзополисахарида.

Вышеназванные результаты трудоемких экспериментов автора расширяют наши знания об экологии генетически измененных штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, что необходимо учитывать при проведении противохолерных мероприятий, а также прогнозировать возможность циркуляции данных микроорганизмов в случае их заноса на конкретную территорию Российской Федерации.

Анализируя полученные результаты, изложенные в автореферате, следует отметить важную в практическом отношении разработку способа идентификации штаммов геновариантов *Vibrio cholera* биовара Эль Тор и дифференциации их по эпидемическому потенциалу на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II. Приоритетность данного способа подтверждена патентом на изобретение (Патент РФ №2560280, приоритет от 23.09.2014 г.). Практическим воплощением разработки явилась сконструированная диссертантом мультиплексная ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, позволяющая выявлять геноварианты *Vibrio cholera* биовара Эль Тор и дифференцировать их на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II на изоляты с низким и высоким потенциалом.

Результаты исследований, оформленные в виде методических рекомендаций: «Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу» (утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

24.06.2014 г., протокол № 5); депонирования в GenBank нуклеотидных последовательностей полных генов изогенных штаммов геновариантов *Vibrio cholera* биовара Эль Тор M1275 (код доступа LRAF 00000000) и M1275D (код доступа LRA G 00000000) соответственно с интактным и делетированным островом пандемичности VSP-I; депонирования в Государственную коллекцию патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» изогенных штаммов геновариантов *Vibrio cholera* биовара Эль Тор M1275 и M1275ΔVSP-I с интактным и делетированным островом пандемичности (KM277 1-2), также свидетельствуют о практической направленности диссертации.

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современного оборудования, имеет, несомненно, научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Материалы диссертации в значительной мере отражены в автореферате и в 10 печатных статьях, из которых 5 опубликованы в журналах из перечня ВАК, один патент на изобретение.

Диссертационная работа Никиты Александровича Плеханова «Анализ структуры и экспрессии генов факторов адаптации у генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор» выполнена на актуальную тему, является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой, имеющей научную ценность и практическую направленность, содержащей новое решение проблемы идентификации и выживаемости в объектах окружающей среды генетически измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, являющихся доминантными возбудителями современной холеры, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология, а автор диссертации Плеханов Н.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по заявленной специальности.

Заведующий лабораторией диагностики
холеры и других кишечных инфекций,
ФКУЗ Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора
доктор медицинских наук, с.н.с.
355035, г. Ставрополь, ул. Советская 13-15
Тел/факс: 8-(865 2)-26-03-12.
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Савельев

В.Н. Савельев

Подпись Савельева В.Н. заверяю:
Начальник отдела кадров
ФКУЗ Ставропольский противочумный
институт Роспотребнадзора



В.В. Демченко